

以本土菌株分解幾丁質生產N-乙醯幾丁寡醣之研究

連德昇、涂瑞澤；余世宗

E-mail: 9125207@mail.dyu.edu.tw

摘要

摘要 近年來有關N-乙醯幾丁寡醣之生理功能的研究持續引起食品與醫藥界之重視。主要由於其多樣化的抗腫瘤 (antitumor) 特性、增強免疫效益 (immuno-enhancing effects)、避免感染的保護性能、抗真菌及抗菌活性等。本研究主要目標為，自台灣本土土壤中篩選出可分解幾丁質成高聚合度之N-乙醯幾丁寡醣之菌株，並藉由發酵槽予以大量製備，同時探討菌體生長、高聚合度之N-乙醯幾丁寡醣的生產、培養基成分和培養條件之關係。本實驗是利用含有0.4% 膠態幾丁質 (colloidal chitin) 之培養基，篩選土壤中可分泌幾丁質酵素 (chitinase) 以分解幾丁質之菌株。本試驗共篩選出Too 1~8等八株菌，藉由菌株生長曲線、活性試驗、水解產物分析等發現，以Too 3之活性最高，Too 6活性最低，而Too 7與8有相似的活性，Too 1、Too 2、Too 5及Too 4有相似的活性但較前者低。另外，於Too 7與Too 8之水解產物可獲得N-乙醯幾丁六醣，其餘菌株之水解產物皆以N-乙醯幾丁二醣為主。以搖瓶培養Too 7經8 h後即進入對數增殖期 (exponential phase)，於16 h後達平衡期 (stationary phase)，培養期間pH值有上升趨勢，可能是菌體利用N-乙醯葡萄糖胺，經代謝產生氨之故。另外，在CB (chitin broth)、CCB (colloidal chitin broth)、GB (glucose broth)三種不同培養基下，以CB所得之酵素產量最高 (192.56 U/g)，其次為CCB (184.21 U/g)，GB為最差 (80 U/g)。此結果顯示Too 7菌株需要在幾丁質誘導物存在下才會分泌幾丁質酵素，因此可判定其屬於誘導型酵素。利用不同氮源添加方式培養Too 7菌株，發現Too 7於基礎培養基中外加無機氮源可增加Too 7之菌體量與幾丁質分解酵素產量，但若只以無機氮作為Too 7生長所需之氮源是不足的。於發酵槽中比較Too 7菌株在CB與限磷培養基中，培養期間水解產物變化。由Too 7菌株於兩種培養基之水解產物生成的情況，發現兩者於對數生長期時，其水解產物皆是以N-乙醯葡萄糖胺為主。另外，在經120 h培養後，N-乙醯幾丁二醣 ((GluNAc)₂) 有隨著時間的延長而上升的趨勢，此情況於兩種培養基中皆有發生。但是以限磷培養基中的N-乙醯幾丁二醣 ((GluNAc)₂) 較為多量，約為0.27 g/L，而CB中約只有0.16 g/L。因此推測菌體量的減少對於較高聚合度之N-乙醯幾丁寡醣的生成有所助益，因為菌體所分泌出的幾丁質酵素量也會相對的減少，使得幾丁質受水解的機會降低，由此一現象可推測，若能控制菌體生成量、水解時間、水解速率、基質濃度以及培養環境，應該可以獲取較高量的高聚合度之N-乙醯幾丁寡醣。 關鍵字：幾丁質、幾丁質酵素、N-乙醯幾丁寡醣

關鍵詞：幾丁質；幾丁質酵素；N-乙醯幾丁寡醣

目錄

目錄封面內頁 頁次 簽名頁 授權書.....	iii
中文摘要.....	iv
英文摘要.....	vi
誌謝.....	ix
目錄.....	x
圖目錄.....	xv
表目錄.....	xviii
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	4
2.1 幾丁質.....	4
2.1.1 簡介.....	4
2.1.2 理化性質.....	9
2.1.3 幾丁質的酵素性分解.....	9
2.2 N-乙醯幾丁寡醣.....	10
2.2.1 簡介.....	10
2.2.2 N-乙醯幾丁寡醣之製備.....	11
2.2.3 N-乙醯幾丁寡醣的分離與純化.....	13
2.3 幾丁質酵素.....	14
2.4 幾丁質酵素之天然分布.....	19
2.4.1 動物之幾丁質酵素.....	19
2.4.2 植物之幾丁質酵素.....	19
2.4.3 微生物之幾丁質酵素.....	20
2.5 幾丁質酵素活性測定.....	21
2.5.1 傳統方法.....	21
2.5.2 快速檢測法.....	21
2.6 幾丁質酵素之應用.....	21
2.6.1 菌體生產之應用.....	21
2.6.2 微生物生理及生化上之應用.....	22
2.6.3 N-乙醯幾丁寡醣之製備.....	22
2.7 幾丁質酵素之生產現況.....	22
2.8 發酵槽簡介.....	25
第三章 材料與方法.....	30
3.1 實驗材料.....	30
3.2 器材.....	31
3.3 實驗方法.....	33
3.3.1 培養基配製.....	33
3.3.2 製備膠態幾丁質.....	35
3.3.3 採樣地點.....	35
3.3.4 篩選菌株.....	35
3.3.5 菌株鑑定.....	36
3.3.6 酵素活性測定.....	36

.....36	3.3.7 還原糖含量.....	37	3.3.8 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳分析 (SDS-PAGE) ...	37	3.3.8.1 定義.....	37	3.3.8.2 操作步驟.....	37
.....37	3.3.9 水解產物前處理.....	40	3.3.10 高效能液相層析儀分析.....	40	3.3.11 酵素之特性探討.....	40	3.3.11.1 粗酵素液之最適基質濃度.....	40
.....41	3.3.11.2 粗酵素液之最適反應時間.....	41	3.3.11.3 粗酵素液之最適溫度.....	41	3.3.11.4 粗酵素液之最適pH值.....	41	3.3.12 發酵槽之發酵試驗.....	41
.....41	3.3.12.1 操作步驟.....	42	第四章 結果與討論.....	43	4.1 前言.....	43	4.2 幾丁質分解菌之篩選、鑑定.....	43
.....43	4.1 前言.....	43	4.2.1 土壤中幾丁質分解菌之篩選.....	43	4.2.2 菌株鑑定.....	46	4.2.3 各菌株之幾丁質分解酵素活性比較.....	46
.....46	4.2.3 各菌株之幾丁質分解酵素活性比較.....	46	4.2.4 各菌株之N-乙醯幾丁寡糖分析.....	55	4.3 Too 7 菌株之特性分析.....	55	4.3.1 Too 7 菌株之生長趨勢.....	55
.....55	4.3.1 Too 7 菌株之生長趨勢.....	55	4.3.2 粗酵素液分解幾丁質之最適條件探討.....	57	4.3.2.1 最適反應時間.....	57	4.3.2.2 最適基質濃度.....	57
.....57	4.3.2.1 最適反應時間.....	57	4.3.2.3 最適溫度.....	61	4.3.2.4 最適pH值.....	61	4.3.3 Too 7 生長過程幾丁質分解酵素之活性變化.....	65
.....61	4.3.2.3 最適溫度.....	61	4.3.4 碳源對Too 7菌體生長、還原糖及幾丁質...分解酵素之影響.....	70	4.3.4.1 菌體量之變化.....	70	4.3.4.2 還原糖之變化.....	70
.....70	4.3.4.1 菌體量之變化.....	70	4.3.4.3 幾丁質分解酵素之活性變化.....	72	4.3.4.4 pH值之變化.....	73	4.3.5 氮源對Too 7菌體生長、還原醣及幾丁質...分解酵素之影響.....	76
.....73	4.3.4.3 幾丁質分解酵素之活性變化.....	72	4.3.5.1 菌體量之變化.....	76	4.3.5.2 還原糖之變化.....	79	4.3.5.3 幾丁質分解酵素之活性變化.....	79
.....76	4.3.5.1 菌體量之變化.....	76	4.3.5.4 pH值之變化.....	82	4.3.6 Too 7 與 Too 8之N-乙醯幾丁寡糖分析.....	82	4.4 發酵槽之發酵試驗.....	85
.....79	4.3.5.2 還原糖之變化.....	79	4.4 發酵槽之發酵試驗.....	85	4.4.1 菌體量之變化.....	85	4.4.2 還原糖之變化.....	87
.....82	4.3.5.3 幾丁質分解酵素之活性變化.....	79	4.4.1 菌體量之變化.....	85	4.4.2 還原糖之變化.....	87	4.4.3 幾丁質分解酵素之活性變化.....	90
.....82	4.3.5.4 pH值之變化.....	82	4.4.2 還原糖之變化.....	87	4.4.3 幾丁質分解酵素之活性變化.....	90	4.4.4 幾丁質含量之變化.....	93
.....85	4.4 發酵槽之發酵試驗.....	85	4.4.3 幾丁質分解酵素之活性變化.....	90	4.4.4 幾丁質含量之變化.....	93	4.4.5 CB與限磷培養基之N-乙醯幾丁寡醣分析.....	93
.....87	4.4.1 菌體量之變化.....	85	4.4.4 幾丁質含量之變化.....	93	第五章 結論與未來展望.....	98	5.1 結論.....	98
.....90	4.4.2 還原糖之變化.....	87	4.4.5 CB與限磷培養基之N-乙醯幾丁寡醣分析.....	93	5.2 未來展望.....	98	5.1 結論.....	98
.....93	4.4.3 幾丁質分解酵素之活性變化.....	90	5.1 結論.....	98	5.2 未來展望.....	98	參考文獻.....	99
.....93	4.4.4 幾丁質含量之變化.....	93	99 參考文獻.....	100	附錄一 還原醣標準曲線.....	109	附錄二 N-乙醯葡萄糖胺標準曲線.....	110
.....98	4.4.5 CB與限磷培養基之N-乙醯幾丁寡醣分析.....	93	100 附錄一 還原醣標準曲線.....	109	附錄三 N-乙醯幾丁二醣標準曲線.....	111	附錄四 N-乙醯幾丁三醣標準曲線.....	112
.....98	5.1 結論.....	98	109 附錄二 N-乙醯葡萄糖胺標準曲線.....	110	附錄五 N-乙醯幾丁四醣標準曲線.....	113	附錄六 N-乙醯幾丁五醣標準曲線.....	114
.....99	5.2 未來展望.....	98	110 附錄三 N-乙醯幾丁二醣標準曲線.....	111	附錄七 N-乙醯幾丁六醣標準曲線.....	115	圖目 錄	115
.....99	參考文獻.....	99	111 附錄四 N-乙醯幾丁三醣標準曲線.....	112	圖2.1 幾丁質、幾丁聚醣之製備及其在食品之應用型式.....	7	圖2.2 幾丁質、幾丁聚醣、纖維素之化學構造.....	8
.....99	參考文獻.....	99	112 附錄五 N-乙醯幾丁四醣標準曲線.....	113	圖2.3 幾丁質酵素之作用機制.....	17	圖2.4 幾丁質的水解物.....	17
.....100	附錄一 還原醣標準曲線.....	109	113 附錄六 N-乙醯幾丁五醣標準曲線.....	114	圖2.5 機械攪拌式發酵槽.....	27	圖2.6 氣舉式發酵槽.....	27
.....109	附錄二 N-乙醯葡萄糖胺標準曲線.....	110	114 附錄七 N-乙醯幾丁六醣標準曲線.....	115	圖4.1 欲篩選的菌株於膠態幾丁質產生透明環之形態.....	44	圖4.2 菌株純化之結果.....	44
.....110	附錄三 N-乙醯幾丁二醣標準曲線.....	111	115 圖目 錄	115	圖4.3 Too 1之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	48	圖4.4 Too 2之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	48
.....111	附錄四 N-乙醯幾丁三醣標準曲線.....	112	圖2.1 幾丁質、幾丁聚醣之製備及其在食品之應用型式.....	7	圖4.5 Too 3之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	49	圖4.6 Too 4之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	49
.....112	附錄五 N-乙醯幾丁四醣標準曲線.....	113	圖2.2 幾丁質、幾丁聚醣、纖維素之化學構造.....	8	圖4.7 Too 5之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	50	圖4.8 Too 6之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	50
.....113	附錄六 N-乙醯幾丁五醣標準曲線.....	114	圖2.3 幾丁質酵素之作用機制.....	17	圖4.9 Too 7之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	51	圖4.10 Too 8之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	51
.....114	附錄七 N-乙醯幾丁六醣標準曲線.....	115	圖2.4 幾丁質的水解物.....	17	圖4.11 各菌株之酵素活性對時間關係圖.....	53	圖4.12 各菌株以CCB培養48 h 後於SDS-PAGE中之圖4.12 幾丁質分解酵素特性.....	54
.....115	圖目 錄	115	圖2.5 機械攪拌式發酵槽.....	27	圖4.12 幾丁質分解酵素特性.....	54	圖4.13 Too 7菌株於CCB中培養之生長曲線.....	58
.....115	圖2.1 幾丁質、幾丁聚醣之製備及其在食品之應用型式.....	7	圖4.1 欲篩選的菌株於膠態幾丁質產生透明環之形態.....	44	圖4.13 Too 7菌株於CCB中培養之生長曲線.....	58	圖4.14 Too 7菌株於CB中培養之生長曲線.....	59
.....7	圖2.2 幾丁質、幾丁聚醣、纖維素之化學構造.....	8	圖4.2 菌株純化之結果.....	44	圖4.14 Too 7菌株於CB中培養之生長曲線.....	59	圖4.15 Too 7之酵素所產生還原糖量對時間之關係圖.....	60
.....8	圖2.3 幾丁質酵素之作用機制.....	17	圖4.3 Too 1之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	48	圖4.15 Too 7之酵素所產生還原糖量對時間之關係圖.....	60	圖4.16 Too 7之酵素所產生還原糖量對基質濃度之關係圖.....	62
.....17	圖2.4 幾丁質的水解物.....	17	圖4.4 Too 2之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	48	圖4.16 Too 7之酵素所產生還原糖量對基質濃度之關係圖.....	62	圖4.17 Too 7之酵素活性對溫度之關係圖.....	63
.....17	圖2.5 機械攪拌式發酵槽.....	27	圖4.5 Too 3之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	49	圖4.17 Too 7之酵素活性對溫度之關係圖.....	63	圖4.18 Too 7之酵素活性對pH之關係圖.....	64
.....27	圖2.6 氣舉式發酵槽.....	28	圖4.6 Too 4之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	49	圖4.18 Too 7之酵素活性對pH之關係圖.....	64	圖4.19 以CB培養基培養Too 7菌株，培養液中幾丁質 圖4.12 分解酵素之活性與還原糖之變化.....	66
.....27	圖4.1 欲篩選的菌株於膠態幾丁質產生透明環之形態.....	44	圖4.7 Too 5之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	50	圖4.19 以CB培養基培養Too 7菌株，培養液中幾丁質 圖4.12 分解酵素之活性與還原糖之變化.....	66	圖4.20 以CCB培養基培養Too 7菌株培養液中幾丁質 圖4.12 分解酵素之活性與還原糖之變化.....	67
.....44	圖4.2 菌株純化之結果.....	44	圖4.8 Too 6之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	50	圖4.20 以CCB培養基培養Too 7菌株培養液中幾丁質 圖4.12 分解酵素之活性與還原糖之變化.....	67	圖4.21 Too 7菌株於CB中之幾丁質分解酵素活性變化.....	68
.....44	圖4.3 Too 1之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	48	圖4.9 Too 7之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	51	圖4.21 Too 7菌株於CB中之幾丁質分解酵素活性變化.....	68	圖4.22 Too 7菌株於CCB中之幾丁質分解酵素活性變化.....	69
.....48	圖4.4 Too 2之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	48	圖4.10 Too 8之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	51	圖4.22 Too 7菌株於CCB中之幾丁質分解酵素活性變化.....	69	圖4.23 Too 7菌株培養於CCB與CB中之菌體量變化情形.....	71
.....48	圖4.5 Too 3之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	49	圖4.11 各菌株之酵素活性對時間關係圖.....	53	圖4.23 Too 7菌株培養於CCB與CB中之菌體量變化情形.....	71	圖4.24 Too 7菌株培養於CCB與CB中之還原糖與酵素產量 圖4.26 變化情形.....	72
.....49	圖4.6 Too 4之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	49	圖4.12 各菌株以CCB培養48 h 後於SDS-PAGE中之圖4.12 幾丁質分解酵素特性.....	54	圖4.24 Too 7菌株培養於CCB與CB中之還原糖與酵素產量 圖4.26 變化情形.....	72	圖4.25 Too 7菌株培養於CB中之幾丁質酵素產量變化情形.....	74
.....49	圖4.7 Too 5之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	50	圖4.13 Too 7菌株於CCB中培養之生長曲線.....	58	圖4.25 Too 7菌株培養於CB中之幾丁質酵素產量變化情形.....	74	圖4.26 碳源對幾丁質分解酵素產量之影響.....	75
.....50	圖4.8 Too 6之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	50	圖4.14 Too 7菌株於CB中培養之生長曲線.....	59	圖4.26 碳源對幾丁質分解酵素產量之影響.....	75	圖4.27 Too 7菌株培養於CCB與CB中之pH變化情形.....	77
.....50	圖4.9 Too 7之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	51	圖4.15 Too 7之酵素所產生還原糖量對時間之關係圖.....	60	圖4.27 Too 7菌株培養於CCB與CB中之pH變化情形.....	77	圖4.28 以不同氮源組合培養Too 7菌株之菌體量 圖4.27 變化情形.....	78
.....51	圖4.10 Too 8之酵素活性與還原糖對時間曲線圖.....	51	圖4.16 Too 7之酵素所產生還原糖量對基質濃度之關係圖.....	62	圖4.28 以不同氮源組合培養Too 7菌株之菌體量 圖4.27 變化情形.....	78	圖4.29 以不同氮源組合培養Too 7菌株之還原糖 圖4.27 變化情形.....	80
.....51	圖4.11 各菌株之酵素活性對時間關係圖.....	53	圖4.17 Too 7之酵素活性對溫度之關係圖.....	63	圖4.29 以不同氮源組合培養Too 7菌株之還原糖 圖4.27 變化情形.....	80	圖4.30 以不同氮源組合培養Too 7菌株之幾丁質 圖4.31 分解酵素產量變化情形.....	81
.....53	圖4.12 各菌株以CCB培養48 h 後於SDS-PAGE中之圖4.12 幾丁質分解酵素特性.....	54	圖4.18 Too 7之酵素活性對pH之關係圖.....	64	圖4.30 以不同氮源組合培養Too 7菌株之幾丁質 圖4.31 分解酵素產量變化情形.....	81	圖4.31 以不同氮源組合培養Too 7菌株之pH 圖4.27 變化情形.....	83
.....54	圖4.13 Too 7菌株於CCB中培養之生長曲線.....	58	圖4.19 以CB培養基培養Too 7菌株，培養液中幾丁質 圖4.12 分解酵素之活性與還原糖之變化.....	66	圖4.31 以不同氮源組合培養Too 7菌株之pH 圖4.27 變化情形.....	83	圖4.32 Too 7菌株培養於CB中之水解產物.....	84
.....54	圖4.14 Too 7菌株於CB中培養之生長曲線.....	59	圖4.20 以CCB培養基培養Too 7菌株培養液中幾丁質 圖4.12 分解酵素之活性與還原糖之變化.....	67	圖4.32 Too 7菌株培養於CB中之水解產物.....	84	圖4.33 Too 8菌株培養於CB中之水解產物.....	86
.....58	圖4.15 Too 7之酵素所產生還原糖量對時間之關係圖.....	60	圖4.21 Too 7菌株於CB中之幾丁質分解酵素活性變化.....	68	圖4.33 Too 8菌株培養於CB中之水解產物.....	86	圖4.34 以發酵槽分別培養Too 7菌株於CB與限磷 圖4.35 培養基中之菌體量變化情形.....	88
.....59	圖4.16 Too 7之酵素所產生還原糖量對基質濃度之關係圖.....	62	圖4.22 Too 7菌株於CCB中之幾丁質分解酵素活性變化.....	69	圖4.34 以發酵槽分別培養Too 7菌株於CB與限磷 圖4.35 培養基中之菌體量變化情形.....	88	圖4.35 以發酵槽分別培養Too 7菌株於CB與限磷 圖4.35 培養基中之還原糖變化情形.....	89
.....60	圖4.17 Too 7之酵素活性對溫度之關係圖.....	63	圖4.23 Too 7菌株培養於CCB與CB中之菌體量變化情形.....	71	圖4.35 以發酵槽分別培養Too 7菌株於CB與限磷 圖4.35 培養基中之還原糖變化情形.....	89	圖4.36 以發酵槽分別培養Too 7	
.....62	圖4.18 Too 7之酵素活性對pH之關係圖.....	64	圖4.24 Too 7菌株培養於CCB與CB中之還原糖與酵素產量 圖4.26 變化情形.....	72	圖4.36 以發酵槽分別培養Too 7			
.....63	圖4.19 以CB培養基培養Too 7菌株，培養液中幾丁質 圖4.12 分解酵素之活性與還原糖之變化.....	66	圖4.25 Too 7菌株培養於CB中之幾丁質酵素產量變化情形.....	74				
.....64	圖4.20 以CCB培養基培養Too 7菌株培養液中幾丁質 圖4.12 分解酵素之活性與還原糖之變化.....	67	圖4.26 碳源對幾丁質分解酵素產量之影響.....	75				
.....66	圖4.21 Too 7菌株於CB中之幾丁質分解酵素活性變化.....	68	圖4.27 Too 7菌株培養於CCB與CB中之pH變化情形.....	77				
.....67	圖4.22 Too 7菌株於CCB中之幾丁質分解酵素活性變化.....	69	圖4.28 以不同氮源組合培養Too 7菌株之菌體量 圖4.27 變化情形.....	78				
.....69	圖4.23 Too 7菌株培養於CCB與CB中之菌體量變化情形.....	71	圖4.29 以不同氮源組合培養Too 7菌株之還原糖 圖4.27 變化情形.....	80				
.....71	圖4.24 Too 7菌株培養於CCB與CB中之還原糖與酵素產量 圖4.26 變化情形.....	72	圖4.30 以不同氮源組合培養Too 7菌株之幾丁質 圖4.31 分解酵素產量變化情形.....	81				
.....72	圖4.25 Too 7菌株培養於CB中之幾丁質酵素產量變化情形.....	74	圖4.31 以不同氮源組合培養Too 7菌株之pH 圖4.27 變化情形.....	83				
.....74	圖4.26 碳源對幾丁質分解酵素產量之影響.....	75	圖4.32 Too 7菌株培養於CB中之水解產物.....	84				
.....75	圖4.27 Too 7菌株培養於CCB與CB中之pH變化情形.....	77	圖4.33 Too 8菌株培養於CB中之水解產物.....	86				
.....77	圖4.28 以不同氮源組合培養Too 7菌株之菌體量 圖4.27 變化情形.....	78	圖4.34 以發酵槽分別培養Too 7菌株於CB與限磷 圖4.35 培養基中之菌體量變化情形.....	88				
.....78	圖4.29 以不同氮源組合培養Too 7菌株之還原糖 圖4.27 變化情形.....	80	圖4.35 以發酵槽分別培養Too 7菌株於CB與限磷 圖4.35 培養基中之還原糖變化情形.....	89				
.....80	圖4.30 以不同氮源組合培養Too 7菌株之幾丁質 圖4.31 分解酵素產量變化情形.....	81						
.....81	圖4.31 以不同氮源組合培養Too 7菌株之pH 圖4.27 變化情形.....	83						
.....83	圖4.32 Too 7菌株培養於CB中之水解產物.....	84						
.....84	圖4.33 Too 8菌株培養於CB中之水解產物.....	86						
.....86	圖4.34 以發酵槽分別培養Too 7菌株於CB與限磷 圖4.35 培養基中之菌體量變化情形.....	88						
.....88	圖4.35 以發酵槽分別培養Too 7菌株於CB與限磷 圖4.35 培養基中之還原糖變化情形.....	89						
.....89	圖4.36 以發酵槽分別培養Too 7							

菌株於CB與限磷 圖4.35 培養基中之幾丁質分解酵素產量變化情形.....91	圖4.37 以發酵槽分別培養Too7菌株於CB與限磷 圖4.35 培養基中單位菌體之酵素產量變化情形.....92
圖4.38 以發酵槽分別培養Too7菌株於CB與限磷 圖4.35 培養基中之幾丁質變化情形.....94	圖4.39 以發酵槽分別培養Too7菌株於CB中之水解 圖4.35 產物變化情形.....95
圖4.40 以發酵槽分別培養Too7菌株於限磷培養基中之 水解產物變化情形.....96	表目錄表2.1 幾丁質、幾丁聚醣及其衍生物在食品工業之應用.....6
表2.2 不同菌株所得幾丁質酵素產量之比較.....23	表4.1 採集樣品之時間、地點及代號.....45
表4.2 篩得菌株之簡單鑑定試驗.....47	表4.3 各菌株之幾丁質分解酵素水解幾丁質之產物.....56

參考文獻

- 參考文獻 王三郎, 水產資源利用學. 高立圖書出版社, 台北(1996). 李建武、蕭能庚、余瑞元、陳麗蓉、陳雅蕙、陳來同、袁明秀, 生物化學實驗原理和方法. 藝軒圖書出版社, 台北(1999). 阮進惠、林翰良、羅淑珍, 幾丁聚醣水解物之連續式生產及其抑菌作用. 中國農業化學會誌, 35(6):596-611 (1997). 邱少華, 利用綠膿桿菌K-187發酵蝦蟹殼廢棄物生產幾丁質酶之應用及量產條件之研究. 大葉大學食品工程研究所碩士文, 彰化(1997). 呂明洲, *Pseudomonas aeruginosa* K-181 所生產幾丁質酵素之探討, 大葉大學食品工程研究所碩士論文, 彰化(1994). 林欣榜, 幾丁類物質在食品加工上之應用, 食品工業, 26-37(1999). 吳豐智、曾如玲, 神奇的物質-幾丁質和幾丁聚醣. 化工技術, 5(7):196-201(1997). 洪啟章, *Bacillus cereus* NTU-FC-4 幾丁質酵素之研究. 台灣大學農業化學研究所碩士論文, 台北(1994). 袁國芳, 幾丁與幾丁聚醣在食品工業上之應用. 食品工業, 19-25(1999). 梁舜欣, N-乙醯幾丁寡醣製備. 台灣大學農業化學研究所碩士論文, 台北(1990). 陳惠婷, 以發酵槽高密度培養 *Penicillium chrysogenum* 生產 penicillin V 之研究. 大葉大學食品工程研究所碩士論文, 彰化(2000). 康建智, 細菌幾丁質酵素基因的誘導表現及生產N-乙醯幾丁寡醣最適化條件的研究. 國立台灣海洋大學食品科學系碩士論文, 基隆(2001). 黃安德, 利用部分純化之 *Amycolatopsis orientalis* 細胞外N-乙醯葡萄糖胺酵素製備N-乙醯幾丁寡醣. 國立台灣海洋大學水產食品科學系碩士學位論文, 基隆(1998). 黃昭仁, 微生物生產幾丁質酵素之研究, 大葉大學食品工程研究所碩士論文, 彰化(1998). 歐宜書, *Pseudomonas aeruginosa* K-187 生產蛋白質分解酵素之研究. 大葉大學食品工程研究所碩士論文, 彰化(1998). 陳幸臣、許嘉珍, 以微生物分解蝦殼製取幾丁質與其部分去乙醯化. 中國農業化學會誌, 35(3):342-353(1997). 陳幸臣, 幾丁質酵素生產與應用. 食品生物技術研討會專輯, 34-41(2000). 陳坤上、黃佩芬、陳聰松、陳幸臣, 幾丁寡醣製備條件之探討. 食品科學, 23(6):874-883(1996). 陳美惠、莊淑惠、吳志津, 幾丁聚醣的物化特性, 食品工業, 1-7(1999). 蘇南維、李敏雄, *Listonella damsela* NTU-FC-6 幾丁質酵素之生產與基本性質之探討. 中國農業化學會誌, 36(1):65-76(1998). 蘇南維, *Listonella damsela* NTU-FC-6 幾丁質酵素之研究. 台灣大學農業化學研究所碩士論文, 台北(1995). 蘇遠志、黃世佑, 微生物化學工程學. 華香園出版社, 台北(1999). 劉瓊淑, 幾丁質、幾丁聚醣及其相關酵素之特性與用. 食品工業, 26(1):26-36(1994). A/Banat, B.M.A., Y. Kameyama, T. Yoshioka, D. Koga, Purification and characterization of a 54kDa chitinase from *Bombyx mori*, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 29:537-547(1999). Aiba S. I., Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with chitinase followed by N-acetylation, *Carbohydr. Res.*, 265:323-328(1994). Amy, L. S., S. M. N. Chadhain, J. A. Moore and D. L. Kirchman, Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different from of chitin, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:408-413(1997). Angel, Z. H., A. B. Angel, Chitinolytic activity from *Neurospora crassa*, *J. Gen. Microbiol.*, 129:3319-3321(1983). Araki, Y., E. Ito, A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*: enzymatic deacetylation of chitin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 56:669-674(1974). Bassler, B. L., C. Yu, A. M. Lee, and S. Roseman, Chitin utilization by marine bacteria, degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio funisii*, *J. Bio. Chem.*, 266:24276-24281(1991). Bhushan, B., Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11, *J. Appl. Microbiol.*, 88:800-808(2000). Bokmaa, E., T. Barendsb, A. C. Terwisscha van Scheltingab, B. W. Dijkstrab, and J. J. Beintemaa, Enzyme kinetics of hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*, *FEBS Lett.*, 478:119-122(2000). Byrne, N. D., M. Duxbury and N. Sharpeb, The determination of chitinase activity of grapes: an introductory enzyme assay, *Biochem. Molec. Biol. Educ.*, 29:144—146(2001). Carroad, D. A. and R. A. Tom, Bioconversion of shellfish chitin waste: process conception and selection of microorganism, *J. Food Sci.*, 43:1158-1164(1978). Chang, K. B., J. Lee and W. R. Fu, HPLC analysis of N-acetyl- chito-oligosaccharides during the acid hydrolysis of chitin, *J. Food Drug Anal.*, 8:75-83(2000). Felle, H. H, E. Kondorosi, A. Kondorosi, M. Schultze, How alfalfa root hairs discriminate between Nod factors and oligochitin elicitors, *Plant Physiol.*, 124:1373-1380(2000). Felse, P. A. and T. Panda, Production of microbial chitinase - A revisit, *Bioproc. Eng.*, 23:127-134(2000). Felse, P. A. and T. Panda, Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred, *Biochem. Eng. J.*, 4:115—120(2000). Hsu, S. C. and J. L. Lockwood, Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil, *Appl. Microbiol.*, 29:422-426(1975). Huang, I. J., W. L. Cheng, C. M. Chiang and M. Y. Lue, Identification and purification of chitinases from bacterium TSC-Ch105, *Rept. Taiwan Sugar Res. Inst.*, 166:67-79(1999). Imoto, I. and K. Yagishita, Simple activity measurement of lysozyme, *Agric. Biol. Chem.*, 72:11154-11156(1971). Kapat, A., T. Panda, pH and thermal stability studies of chitinase from *Trichoderma harzianum*: A thermodynamic consideration, *Bioproc. Eng.*, 16:269-272(1997). Knorr, D., Use of chitinous polymer in food, *Food Technol.*, 1:85-89(1984). Koga, D., N. Sueshige, K. Orikono, T. Utsumi, S. Tanaka, Y. Yamada and A. Ide, Efficiency of chitinolytic enzyme in the formation of *Trichoderma matsutake* protoplasts, *Agric. Biol. Chem.*, 52:2091-2094(1988). Koga, D., Y. Sasaki, Y. Uchiumi, N. Hirai, Y. Arakane and Y. Nagamatsu, Purification and characterization of *Bombyx mori* chitinase, *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 27:757-767(1997). Koga, K, Y. Iwamoto, H. Sakamoto, K. Hatano, M. Sano and I. Kato, Purification and characterization of beta-N-acetylhexosaminidase from *Trichoderma harzianum*, *Agric Biol Chem.*, 55:2817-2823(1991). Kurita,

K., Chemistry and application of chitin and chitosan, *Polym. degradation stab.*, 59:117-120 (1998). Lee, H.S., D.S. Han, S. J. Choi, S. W. Choi, D. S. Kim, D. H. Bai and J. H. Yu, Purification and characterization, and primary structure of a chitinase from *Pseudomonas* sp. YHS-A2, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54:397-405 (2000). Lonhienne, T., E. Baise, G. Feller, V. Bouriotis and C. Gerday, Enzyme activity determination on macromolecular substrates by isothermal titration calorimetry : application to mesophilic and psychrophilic chitinases, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1545:349-356 (2001). Mabuchi, N., I. Hashizume and Y. Araki, Characterization of chitinase excreted by *Bacillus cereus* CH, *Can. J. Microbiol.*, 46:370-375 (2000). Mitsutomi, M., T. Hata and T. Kuwahara, Purification and characteristics of Novel chitinases from *Streptomyces griseus* HUT 6037, *J. Ferment. Bioeng.*, 80:153-158 (1995). Muraki, E., F. Yaku and H. Kojima, Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 6-8, *Carbohydr. Res.*, 239:227-237 (1993). Muzzarelli, R. A. A., Chitin, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 : 1718-1724 (1997). Nielsen, M. N., J. Sorensen, Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 30:217-227 (1999). Ohishi K., M. Yamagishi, T. Ohta, M. Suzuki, H. Izumida, H. Sano, M. Nishuima and T. Miwa, Purification and characteristics of two chitinases from *Vibrio alginolyticus* H-8, *J. Ferment. Bioeng.*, 82:598-600 (1996). Sakai, K., A. Yokota, H. Kurokawa, M. Wakayama and M. Moriguchi, Purification and Characterization of Three Thermostable Endochitinases of a Noble *Bacillus* Strain, MH-1, Isolated from Chitin-Containing Compost, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:3397—3402 (1998). Sakai K, M. Narihara, Y. Kasama, M. Wakayama and M. Moriguchi, Purification and characterization of thermostable beta-N-acetyl- hexosaminidase of *Bacillus stearothermophilus* CH-4 isolated from chitin-containing compost, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:2911-2915 (1994). Sakurada M., D. P. Morgavi, K. Komatani, Y. Tomita and R. Onodera, Purification and characteristics of an autolytic chitinase of *Piromyces communis* OTS1 from culture medium, *Cur. Microbiol.*, 35:48-51 (1997). Shahidi, F., Vidana Arachchi, J.K., and Jeon, Y.J., Food applications of chitin and chitosan, *Trends Food Sci. Technol.*, 10:37-51 (1999). Shimoda, K., K. Nakajima, Y. Hiratsuka, S. I. Nishimura and K. Kurita, Efficient preparation of β -(1-6)-(GlcNAc)₂ by enzymatic conversion of chitin and chito-oligosaccharides, *Carbohydr. Polym.*, 29:149-154 (1996). Suginta, W., P.A.W. Robertson, B. Austin, S.C. Fry and L.A. Fothergill-Gilmore, Chitinases from *Vibrio*: activity screenig and purification of chA from *Vibrio carchariae*, *J. Appl. Microbiol.*, 89:76-84 (2000). Suresh, P.V., M. Chandrasekaran, Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation, *Proc. Biochem.*, 34:257—267 (1999). Svitil, A. L., S. M. N. Chadhain, J. A. Moore and D. L. Kirchman, Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin, *Appl. Environ. Microbiol.* 63:408-413 (1997). Tang, S. C., M. C. Chang and C. Y. Cheng, Use of colloid chitin and diatomaceous earth in continuous cake-filtration fermentation to produce creatinase, *Proc. Biochem.*, 33:519-526 (1998). Thamthiankul, S., S. Suan-Ngay, S. Tantimavanich and W. Panbangred, Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. Pakistani, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56:395—401 (2001) Tokuyasu, K., H. Ono, Mayumi O.K., Kiyoshi H. and Yutaka M., Deacetylation of chitin oligosaccharides of dp 2-4 by chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*, *Carbohydr. Res.*, 303:353-358 (1997) Tsigos, I., N. Zydowicz, A. Martinou, A. Domard and V. Bouriotis, Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitooligosaccharides, *Eur. J. Biochem.*, 261:698-705 (1999). Tsutomu, T., A. Kasumi, T. Yasuyaki and S. Venzo, Isolation and characterization of the most stable chitinase from *Bacillus licheniformis*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1078:404-411 (1991). Wang, S. L., J. R. Hwang, Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of chitinases, *Enzyme Microb. Technol.*, 28:376—382 (2001). Wang, S. Y., A. L. Moyne, G. Thottappilly, S. J. Wu, R. D. Locy and N. K. Singh, Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase, *Enzyme Microb. Technol.*, 28:492-498 (2001). Wiwat, C., P. Siwayaprahm and A. Bhumiratana, Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1, *Cur. Microbiol.*, 39:134-140 (1999). Yamamoto, Y., Y. Fukunaga, H. Aoyagi and H. Tanaka, Purification and characteristics of chitinase secreted by cultured *Wasabia japonica* cells, *J. Ferment. Bioeng.*, 80:148-152 (1995). Usami, Y., Y. Okamoto, T. Takayama, Y. Shigemasa and S. Minami, Effect of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine oligomer on canine polymorphonuclear cells in vitro, *Carbohydr. Polym.*, 36:137-141 (1998).